



2-16-01

0500
0400

PATENT
Attorney Docket No. 208753

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:

Hattori et al.

Art Unit: Unassigned

Application No. 09/765,865

Examiner: Unassigned

Filed: January 18, 2001

For: NOVEL PLASMID, BEARING THE PLASMID, AND
METHOD OF PRODUCING AN ENZYME USING THE
TRANSFORMANT

CLAIM OF PRIORITY

Commissioner of Patents and Trademarks
Washington, D.C. 20231

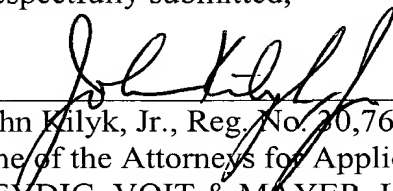
Dear Sir:

Applicant(s) in the above-identified application, through the undersigned attorney, hereby requests that the above-identified application be treated as entitled to the right accorded by Title 35, U.S. Code, Section 119, having regard to the application, which particulars are set out below:

In Japan, Application No. 2000-013264, filed January 21, 2000.

A certified copy of the priority document is enclosed.

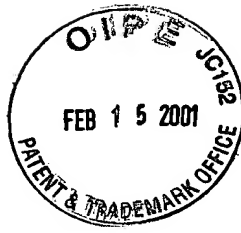
Respectfully submitted,



John Kilyk, Jr., Reg. No. 20,763
One of the Attorneys for Applicant(s)
LENDIG, VOIT & MAYER, LTD.
Two Prudential Plaza, Suite 4900
180 North Stetson
Chicago, Illinois 60601-6780
(312) 616-5600

Date: February 13, 2001

In re Appln. of Hattori et al.
Application No. 09/765,865



CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that this CLAIM OF PRIORITY (along with any documents referred to as being attached or enclosed) is being deposited with the United States Postal Service on the date shown below with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to: Commissioner of Patents and Trademarks, Washington, D.C. 20231.

Date: February 13, 2001

John K. H. Jr.



日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

2000年 1月21日

出 願 番 号
Application Number:

特願2000-013264

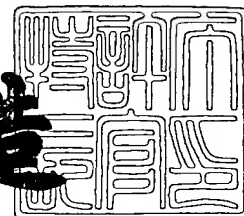
出 願 人
Applicant (s):

東洋紡績株式会社

2001年 1月 5日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3109097

【書類名】 特許願

【整理番号】 CN00-0031

【提出日】 平成12年 1月21日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 9/00

【発明者】

 【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社
敦賀バイオ研究所内

 【氏名】 服部 静夫

【発明者】

 【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社
敦賀バイオ研究所内

 【氏名】 曾我部 敦

【発明者】

 【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社
敦賀バイオ研究所内

 【氏名】 竹嶋 誠嗣

【発明者】

 【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社
敦賀バイオ研究所内

 【氏名】 川村 良久

【特許出願人】

 【識別番号】 000003160

 【氏名又は名称】 東洋紡績株式会社

 【代表者】 津村 準二

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 000619

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】新規プラスミド、それを含む形質転換体、及びそれを用いた酵素の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 PQQを補欠分子族とする酵素の遺伝子を含むDNA断片が接合伝達能を予め除去された広域宿主ベクターに組み込まれてなり、シュードモナス属細菌内で発現可能であることを特徴とするプラスミド。

【請求項2】 広域宿主ベクターが不和合性P-4群に属するプラスミドである請求項1記載のプラスミド。

【請求項3】 PQQを補欠分子族とする酵素がグルコースデヒドロゲナーゼである請求項1または2に記載のプラスミド。

【請求項4】 請求項1～3のいずれかに記載のプラスミドがPQQを補欠分子族とする酵素の生産能を有する細菌に導入されてなることを特徴とする形質転換体。

【請求項5】 PQQを補欠分子族とする酵素の生産能を有する細菌がシュードモナス (Pseudomonas) 属細菌である請求項4記載の形質転換体。

【請求項6】 請求項4または5に記載の形質転換体を栄養培地で培養し、培養液中にPQQを補欠分子族とする酵素を生産せしめた後、該培養液よりPQQを補欠分子族とする酵素を採取することを特徴とするPQQを補欠分子族とする酵素の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はPQQを補欠分子族とする酵素遺伝子を含む組換えDNA、それを含むPQQを補欠分子族とする酵素の生産能を有する細菌の形質転換体、及びそれを用いたPQQを補欠分子族とする酵素の製造法に関する。

グルコースデヒドロゲナーゼ（以下、GDHとも示す）を始めとするPQQを補欠分子族とする酵素は人工電子受容体を不可逆反応で還元することにより、その酵素に対応した各種化合物の高感度定量に適している。例えば、上記GDHは

グルコースの高感度定量に適している。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

PQQ (Pyrrolo Quinoline Quinone) は脱水素酵素の第三の補酵素として、1979年に化学構造が決定されたが、メタノール酸化性菌のメタノール脱水素酵素や酢酸菌のアルコール脱水素酵素やグルコース脱水素酵素を中心に、多くの生物において、主として脱水素酵素でその存在が確認されている。

これらの脱水素酵素は人工電子受容体を還元できるので、ニトロブルーテトラゾリウムのような色素を用いると可視光で、しかも感度よく検出できること、およびNAD依存性脱水素酵素のように平衡反応ではなく一方向への反応であるので、微量な化合物の定量に極めて有用であるとされている (Methods Enzymol. 第89巻、20 (1982))

【 0 0 0 3 】

PQQを補欠分子族とする酵素の中で最も有用性の高いのは、PQQ依存性GDHであり、血糖の測定に用いることができる。実際の使用に関しては、通常の生化学試薬としての使用はもちろん、膜に固定したドライ試薬の呈色反応やチップに固定したセンサー用途等幅広く応用することが可能である。グルコースに同様に作用するグルコースオキシダーゼやNAD(P)依存性GDHと比較し、溶存酸素の影響を受けないことや、反応がシンプルなためデバイスを簡単に、しかも安価にできることが特徴である。

【 0 0 0 4 】

上記PQQを補酵素とするGDHのクローニングはアシネトバクター・カルコアセチカス (Acinetobacter calcoaceticus) LMD79.41株 (J.Bacteriol., 170、2121(1988)およびMol.Gen.Genet.,217、430(1989) 、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) (J.Bacteriol.,172、6308(1990))、グルコノバクター・サブオキシダンス (Gluconobacter suboxydans) (Mol.Gen.Genet.,229、206 (1991)) 等で報告されており、大腸菌での発現も報告されている。

【 0 0 0 5 】

遺伝的によく解析されており、かつ形質転換する宿主として最適化されている

大腸菌をはじめとする腸内細菌はPQQを産生しないことが知られており、もしPQQを補欠分子族とするGDHをコードする遺伝子断片を組み込んでなるベクターで大腸菌を形質転換し、該大腸菌を培養しても活性のないアポ型GDHしか得られないことが知られている。これらのアポ型GDHは外からPQQを加えることにより活性のあるホロ型GDHに変換可能であるが、必要とするPQQは試薬として非常に高価である。また、工業用スケールでは全てのアポ型がホロ型に変換されないことが確認されている。

【0006】

また、Biotechnol.Lett.,16, 12, 1265 (1994) は形質転換大腸菌を培養する際、培地にPQQを加えて活性のあるホロ型GDHを生産することが報告されているが、この場合も高価なPQQを多量に用いる必要がある。さらに、Mol.Gen.Genet.229, 206 (1991) には、グルコノバクター・オキシダンスのGDHをコードする遺伝子断片をグルコノバクター・オキシダンス自身の染色体に組み込んで発現させているが、この場合は染色体上に存在し、多コピーでないため発現量は小さいという問題がある。

【0007】

そこで本発明者らは、特開平11-243949号公報において報告しているように、PQQを補欠分子族とするGDHをコードする遺伝子を含むDNA断片を組み込んでなる組換えベクターで形質転換されたPQQを補欠分子族とするGDH生産能を有する微生物を培養することによって安価にGDHを大量生産できることを見出した。その一例として、例えばGDHをコードする遺伝子を広宿主域ベクターpTS1137に組み込んでなる発現ベクターpGLD3で形質転換したシュドモナス・プチダを用いてGDHを生産する方法が開示されている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

上記生産系に使用している発現ベクターpTS1137は、不和合性P-4に属するRSF1010、R1162と同一の構造を持つR1b679をベースにTOLプラスミド由来と考えられるプロモーター（pTN8プロモーター）を導入しており、本プロモーターは構成発現が可能なため、誘導物質非存在下で目的

遺伝子の高生産が期待できる。しかしながら、R 1 b 6 7 9と同様に、p T S 1 1 3 7も自己伝達性遺伝子t r aを保有しないが、共役伝達性遺伝子m o bを有しており、他の菌株に接合伝達する恐れがある。即ち、工業スケール生産時に、上記プラスミドを保有する組換え菌が万一漏出した場合、R P 4のようなヘルパープラスミドを保有する微生物との接触時に、G D Hを含むプラスミドが伝達し、組換え体の封じ込めと言った安全面での課題を有していた。

【 0 0 0 9 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記目的を達成するために種々検討した結果、使用する広域宿主ベクターの接合伝達能を除去することで、安全にP Q Qを補欠分子族とする酵素を大量発現させることができることを見出し、本発明を完成させるに至った。

即ち、本発明は以下のような構成からなる。

(1) P Q Qを補欠分子族とする酵素の遺伝子を含有するD N A断片が接合伝達能を予め除去された広域宿主ベクターに組み込まれてなり、シュードモナス属細菌内で発現可能であることを特徴とするプラスミド。

(2) 広域宿主ベクターが不和合性P - 4群に属するプラスミドである(1)のプラスミド。

(3) P Q Qを補欠分子族とする酵素がグルコースデヒドロゲナーゼである(1)または(2)のプラスミド。

(4) (1) ~ (3)のいずれかに記載のプラスミドがP Q Qを補欠分子族とする酵素の生産能を有する細菌に導入されてなることを特徴とする形質転換体。

(5) P Q Qを補欠分子族とする酵素の生産能を有する細菌がシュードモナス(Pseudomonas)属細菌である(4)の形質転換体。

(6) (4)または(5)の形質転換体を栄養培地で培養し、培養液中にP Q Qを補欠分子族とする酵素を生産せしめた後、該培養液よりP Q Qを補欠分子族とする酵素を採取することを特徴とするP Q Qを補欠分子族とする酵素の製造法。

【 0 0 1 0 】

【発明の実施の形態】

本発明において、P Q Qを補欠分子族とする酵素の遺伝子を含有するD N A断

片は、それぞれの酵素生産菌より得ることができる。例えば、GDH遺伝子を含む遺伝子断片はアシネトバクター・カルコアセチカス (*Acinetobacter calcoaceticus*)、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*)、グルコノバクター・サブオキシダンス (*Gluconobacter suboxydans*) から得ることができる。また、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子を含む遺伝子断片はシュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・エルギノサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、シュードモナス・テストステロニ (*Pseudomonas testosteroni*) 等より、グリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子を含む遺伝子断片はシュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) 等より、ソルビトールデヒドロゲナーゼ遺伝子を含む遺伝子断片はグルコノバクター・サブオキシダンス (*Gluconobacter suboxydans*) 等より得ることができる。

上記のようなPQQを補欠分子族とする酵素をコードする遺伝子はこれらの菌株より抽出してもよく、また化学的に合成することもできる。さらにPCR法の利用により、得ることも可能である。

【0011】

本発明において、PQQを補欠分子族とする酵素をコードする遺伝子を得る方法としては次のような方法が挙げられる。

例えば、PQQを補欠分子族とするGDH遺伝子を実験バクテリア・カルコアセチカスNCIMB11517株より得る場合、アシネトバクター・カルコアセチカスNCIMB11517の染色体を分離、精製した後、超音波処理、制限酵素処理を用いてDNAを切断したものと、リニアな発現ベクターと両DNAの平滑末端または付着末端においてDNAリガーゼなどにより結合閉鎖させて組換えベクターを構築する。該組換えベクターを複製可能な宿主微生物に移入した後、ベクターのマーカーと酵素活性の発現を指標としてスクリーニングして、PQQを補欠分子族とするGDHをコードする遺伝子を含む組換えベクターを保持する微生物を得る。

次いで、上記組換えベクターを保持する微生物を培養して、該培養微生物の菌体から該組換えベクターを分離、精製し、該発現ベクターからGDHをコードする遺伝子を採取することができる。

【0012】

該遺伝子供与微生物を例えば1～3日間攪拌培養して得られた培養液を遠心分離により集菌し、次いで、これを溶菌させることによりPQQを補欠分子族とするGDH遺伝子の含有溶菌物を調製することができる。溶菌の方法としては、例えばリゾチーム等の溶菌酵素により処理が施され、必要に応じてプロテアーゼや他の酵素や、あるいはラウリル硫酸ナトリウム（SDS）等の界面活性剤が併用される。さらに、凍結融解やフレンチプレス処理のような物理的破碎方法と組み合わせてもよい。

【0013】

上記のようにして得られた溶解物からDNAを分離精製するには、常法に従って、例えばフェノール処理やプロテアーゼ処理による除蛋白処理や、リボヌクレアーゼ処理、アルコール沈殿処理などの方法を適宜組み合わせることにより行うことができる。

微生物から分離、精製されたDNAを切断する方法は、例えば超音波処理、制限酵素処理などにより行うことができる。好ましくは特定のヌクレオチド配列に作用するII型制限酵素が適している。

【0014】

クローニングする際のベクターとしては、宿主微生物内で自律的に増殖し得るファージまたはプラスミドから遺伝子組換え用として構築されたものが適している。ファージとしては、例えばエシェリヒア・コリを宿主する微生物とする場合にはLambda gt10、Lambda gt11などが例示される。また、プラスミドとしては、例えばエシェリヒア・コリを宿主微生物とする場合には、pBR322、pUC19、pBluescriptなどが例示される。

【0015】

クローニングの際、上記のようなベクターを、上述したようなGDHをコードする遺伝子供与体である微生物DNAの切断に使用した制限酵素で切断してベクター断片を得ることができるが、必ずしも該微生物DNAの切断に使用した制限酵素と同一の制限酵素を用いる必要はない。例えば微生物DNA断片の付着末端とベクター断片の付着末端とのアニーリングの後、適当なDNAリガーゼの使用

により微生物DNA断片とベクターDNA断片との組換えベクターを作製する。必要に応じて、アニーリングの後、宿主微生物に移入して生体内のDNAリガーゼを利用し、組換えベクターを作製することもできる。

【0016】

クローニングに使用する宿主微生物としては、組換えベクターが安定であり、かつ自律増殖可能で外来性遺伝子の形質発現できるものであれば、特に制限されない。一般的には、エシェリヒア・コリW3110、エシェリヒア・コリC600、エシェリヒア・コリHB101、エシェリヒア・コリJM109、エシェリヒア・コリDH5 α などを用いることができる。

宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主微生物がエシェリヒア・コリの場合にはカルシウム処理によるコンピテントセル法やエレクトロポレーション法などを用いることができる。

【0017】

上記のように得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることにより、多量のPQQを補欠分子族とする酵素を安定に生産し得る。宿主微生物への目的組換えベクターの移入の有無についての選択は、目的とするDNAを保持するベクターの薬剤耐性マーカーとPQQの添加により酵素活性を同時に発現する微生物を検索すれば良い。例えば、薬剤耐性マーカーに基く選択培地で生育し、かつPQQを補欠分子族とする酵素を生成する微生物を選択すれば良い。

【0018】

上記のようにして、一般選択されたPQQを補欠分子族とするGDH遺伝子を保有する組換えベクターより、PQQを補欠分子族とするGDH生産能を有する微生物にて複製できる組換えベクターへの移入は、PQQを補欠分子族とする酵素遺伝子を保持する組換えベクターから制限酵素やPCR法により酵素遺伝子であるDNAを回収し、他のベクター断片と結合させることにより容易に実施できる。また、これらのベクターによるPQQを補欠分子族とするGDH生産能を有する微生物の形質転換は、カルシウム処理によるコンピテントセル法やエレクトロポレーション法などを用いることができる。

【0019】

PQQを補欠分子族とする酵素のGDHを有する微生物としては、メチロバクテリウム (*Methylobacterium*) 属等のメタノール酸化性菌、アセトバクター (*Acetobacter*) 属やグルコノバクター (*Gluconobacter*) 属の酢酸菌、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*) 属、シュードモナス属、アシネトバクター属等の細菌を挙げることができる。なかでも、シュードモナス属細菌とアシネトバクター属細菌は、利用可能な宿主-ベクター系が確立されており利用しやすいので好ましい。

シュードモナス属細菌では、シュードモナス・エルギノサ、シュードモナス・フルオレッセンス、シュードモナス・プチダなどを用いることができる。また、アシネトバクター属細菌ではアシネトバクター・カルコアセティカス、アシネトバクター・パウマン二等を用いることができる。

【0020】

上記微生物において複製できるベクターとしては、例えばシュードモナス属のベクターを挙げることができる。これらは不和合性群P-1からP-11に分類されている（（株）サイレンスフォーラム発行；遺伝子組換え実用化技術 第4集、第73～85頁（昭和58年））。

それぞれ例示すると、P-1群としてRP4、RP1、RK2、P-2群としてpMG1、P-3群としてpMG7、P-4群としてRSF1010、R1b679、R1162、P-5群としてRms163、P-6群としてRms149、P-7群としてRsm148、P-8群としてFP2、P-9群としてR2、P-10群としてpSR、P-11群としてRP1-1、pSaを挙げることができる。上記のうちP-1群、P-3群、P-4群、P-6群のプラスミド等は、所謂、広宿主域ベクターである。これらの広宿主域ベクターは、種々のグラム陰性菌、一部のグラム陽性菌で複製でき、ベクターとして使用することができるものである。

【0021】

上記プラスミドのうち、P-1群からP-11群はP-4群を除いて、全て自己接合伝達遺伝子traを持ち、生物学的封じ込めに難があるので、P-4群のプラスミドを用いることが望ましい。しかしながら、Thomasらは、J.Bacteriol.

,141,213(1980)においてP-1群に属するプラスミドRK2よりミニプラスミドpRK290を作製したが、このプラスミドは自己接合伝達能を欠失していることより、同様の試みが他の群を含む広い範囲のプラスミドで可能である。

しかしながら、上記P-4群のプラスミドRSF1010、R1b679、R1162、同じ不和合群に属する高発現ベクターpTS1137やpRK290にはP-1群プラスミドと共役して接合能を示す共役接合伝達能を示すmob遺伝子を有し、生物学的封じ込めでは完全ではない。

【0022】

本発明に使用する接合伝達能を予め除去された広域宿主ベクターに組み込んだシュードモナス属細菌内で発現可能なプラスミドとしては上記のような高発現ベクターpTS1137由来のpTM33を挙げることができる。また、Mol.Gen.Genet.,206,161 (1987)に記載されているRSF10101由来のpED401、pED403、pED405、pED407、pED409、pED412、pED359、pED141、pED142、pED144、PED145、pED146や、Gene,113,101(1992)に記載されているRSF1010由来のRSF1010Δ18、RSF1010Δ13、RSF1010Δ20、RSF1010Δ201も好ましい。

形質転換体である宿主微生物の培養形態は、宿主の栄養生理学的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、多くの場合は液体培養で行う。工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。

【0023】

培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては資化可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコース、シュークロース、ラクトース、マルトース、糖蜜、ピルビン酸などが使用される。また、窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えば、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

【 0 0 2 4 】

培養温度は菌が生育し、PQQを補欠分子族とする酵素を生産する範囲で適宜変更し得るが、通常の場合、好ましくは20～42℃程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、PQQを補欠分子族とする酵素が最高収量に達する時期を見計らって適當時期に培養を完了すればよく、通常は12～72時間程度である。培地のpHは菌が生育し、PQQを補欠分子族とする酵素を生産する範囲で適宜変更し得るが、好ましくはpH6.0～9.0程度の範囲である。

【 0 0 2 5 】

培養液中のPQQを補欠分子族とする酵素を生産する菌体を含む培養液をそのまま採取し利用することもできるが、一般には、常法に従って、PQQを補欠分子族とする酵素が培養液中に存在する場合はろ過、遠心分離などにより、酵素含有溶液と微生物菌体とを分離した後に利用される。酵素が菌体内に存在する場合には、得られた培養液からろ過または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いで、この菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的で破壊し、また必要に応じて、EDTA等のキレート剤及び界面活性剤を添加して酵素を可溶化し、水溶液として分離採取する。

【 0 0 2 6 】

上記のようにして得られたPQQを補欠分子族とする酵素含有溶液を、例えば減圧濃縮、膜濃縮、さらに硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、あるいは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈殿法により沈殿せしめればよい。また、加熱処理や等電点電気泳動も有効な精製手段である。その後、吸着剤あるいはゲルろ過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等を行うことにより、精製した酵素を得ることができる。

【 0 0 2 7 】

例えば、セファデックス (Sephadex) ゲル (ファルマシアバイオテク製) などによるゲルろ過、DEAEセファロースCL-6B (ファルマシアバイオテク製)、オクチルセファロースCL-6B (ファルマシアバイオテク製) 等のカラムクロマトグラフィーにより分離、精製し、精製酵素標品を得ることができる。該

精製酵素標品は、電気泳動（SDS-PAGE）的に単一のバンドを示す程度に純化されていることが好ましい。

【0028】

上記のようにして得られた精製酵素標品を、例えば凍結乾燥、真空乾燥やスプレードライなどにより粉末化して流通させることが可能である。その際、精製酵素標品はリン酸緩衝液、トリス-塩酸緩衝液やGOODの緩衝液に溶解しているものを用いることができる。また、カルシウムイオンまたはその塩、およびグルタミン酸、グルタミン、リジン等のアミノ酸類、さらに血清アルブミン等を添加することによりPQQを補欠分子族とする酵素をより安定化することができる。

【0029】

本発明において、PQQを補欠分子族とするGDH活性の測定は以下の条件で行う。

<試薬>

50 mM PIPES 緩衝液 (pH 6.5)

0.2 mM PMS

0.2 mM NTB

30.6 mM グルコース

0.19% トリトンX-100

<測定条件>

上記試薬混液 3 ml を 37℃ で約 5 分間予備加温後、0.1 ml の酵素溶液を加え、緩やかに混和後、水を対照に 37℃ に制御された分光光度計で、570 nm の吸光度を 5 分間記録し、その直線部分から 1 分間あたりの吸光度変化を測定する。盲検は酵素溶液の代わりに蒸留水を試薬混液に加えて、以下同様に吸光度変化を測定する。上記条件で 1 分間に $1/2 \mu\text{mol}$ のジホルマザンを生成する酵素量を 1 単位 (U) とする。

【0030】

【実施例】

以下、本発明を、実施例を挙げることにより具体的に説明する。

【0031】

実施例1 接合伝達能除去ベクターの作製

広宿主域ベクター pTS1137 の共役接合伝達性遺伝子群 mob を含む断片を BamHI、EcoRI で切断後、同じ制限酵素で切断した pBluescript SK(-) と連結し、pTSEB を得た。

【0032】

次に、配列番号1（順鎖）及び配列番号2（逆鎖）に示すような塩基配列を有する変異導入用プライマーを作製した。

上記プライマーを用い、Transformer site directed mutagenesis kit（クロンテック社製）を利用して、mobC と oriT を含む 258bp を欠失させることにより pTSEB2 を得た。更に、pTSEB2 を BstZ17I で切断後、Mung Bean Nuclease、ExonucleaseIII で消化し、Klenow Fragment で修復して pTSEB15 を得た。pTSEB15 は BamHI、EcoRI で切断した後、同じく BamHI、EcoRI で切断した pTS1137 と連結し、pTM33 を得た（図1）。

【0033】

実施例2 接合伝達能の評価

実施例1 で作製したベクターの接合伝達能は以下の方法で評価した。

pTM33 で形質転換されたエシェリヒア・コリ JM109 株、エシェリヒア・コリ C600 (RK2) 株、エシェリヒア・コリ XL2-Blue MRF' 株をそれぞれストレプトマイシン 100 μ g/ml を含む LB 液体培地、カナマイシン 10 μ g/ml を含む LB 液体培地、クロラムフェニコール 20 μ g/ml を含む LB 液体培地に植菌し、それぞれ 30℃、37℃、37℃ で OD660 が 1～2 になるまで振とう培養した。

次いで、培養の終了した各々の培養液を 1ml ずつ分取して混合し、滅菌したニトロセルロースフィルター（ポアサイズ 0.45 μ m）上に集菌する。このフィルターを、抗生物質を含まない LB 寒天培地に載せ、33℃ にて 4 時間インキュベートした。その後、フィルター上の菌体を 2ml の滅菌した生理食塩水にて希釈し、クロラムフェニコール（Cam: 20 μ g/ml）を含む LB 寒天培地、及びクロラムフェニコール（20 μ g/ml）とストレプトマイシン（Sm:

100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含む LB 寒天培地にそれぞれ塗布し、33℃で24時間培養し、生育するコロニー数を計測した。その結果を表1に示す。

【0034】

【表1】

希 釈	10 ⁻⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
LB 寒天培地 (Cam)	—	—	—	—	—	275	28
LB 寒天培地 (Cam, Sm)	2	0	—	—	—	—	—

—は試験しなかったことを示す

【0035】

上記の結果より、pTM33の共役接合伝達の効率は $2 \times 100 / 275 \times 10^5 = 7.3 \times 10^{-6}$ となった。この値は同様に実施したpTM1137の 2.5×10^{-2} よりはるかに低く、共役接合伝達能はほとんど存在しないと考えられた。

【0036】

実施例3 PQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼ発現ベクターの作製

アシネトバクター・カルコアセティカスNCIMB11517由来のPQQを補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子をコードするベクターpGLD5よりGDH遺伝子断片をBamHI、XhoIで切り出し、実施例1で作製したpTM33のBamHI、XhoI間に挿入し、pGLD6を得た。

【0037】

実施例4 PQQ生産能を有する微生物の形質転換体の作製

シュードモナス・プチダTN1126株をLBG培地 (LB培地+0.3%グリセロール) で30℃、16時間培養し、遠心分離 (12000rpm、10分間) により菌体を回収して、該菌体に氷冷した300mMシュクロースを含む5mM

Kーリン酸緩衝液 (pH7.0) 8mlを加え、菌体を懸濁した。再度遠心分離 (12000rpm、10分間) により菌体を回収し、この菌体に氷冷した300mMシュクロースを含む5mM Kーリン酸緩衝液 (pH7.0) 0.

4 m l を加え、菌体を再懸濁した。

該懸濁液に実施例 3 で得たプラスミド DNA (p G L D 6) 0. 5 μ g を加え、エレクトロポレーション法により形質転換した。5 0 μ g / m l ストレプトマイシンを含んだ L B 寒天培地に生育したコロニーより、P Q Q を補欠分子とする可溶性 G D H 活性を有するクローンを得た。

【 0 0 3 8 】

実施例 5 P Q Q を補欠分子族とするグルコースデヒドロゲナーゼの生産

実施例 4 で得られた形質転換体を Terrific broth 5 0 m l (1. 2 % ポリペプトン、2. 4 % 酵母エキス、0. 4 % N a C l、1 7 m M K H₂P O₄、7 2 m M K₂H P O₄、p H 7. 0) で 3 0 °C、2 4 時間培養し、遠心分離 (1 2, 0 0 0 r p m、3 分間) により菌体を回収した。該菌体を 1 m M の C a C l₂ を含んだ 5 0 m M P I P E S - N a O H 緩衝液 (p H 7. 5) に懸濁後、超音波により菌体を破碎した。遠心分離 (1 2 0 0 0 r p m、5 分間) によって菌体残さを除去した。粗酵素液を調製後、G D H 活性を測定した。その結果を表 2 に示す。

【 0 0 3 9 】

【表 2】

形質転換体	活性発現量 (U / m l)
P. putida TN1126/pGLD6	2 7

培養液 1 m l 当たりの酵素活性

【 0 0 4 0 】

【発明の効果】

上述したように、本発明のプラスミドを用いることにより、P Q Q を補欠分子族とする酵素を、予め接合伝達能を削除したベクターの形質転換体を培養することにより、安全にしかも安価に効率よく生産することが可能になった。

【 0 0 4 1 】

【配列表】

配列番号 1

配列の長さ：48

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCGCCTTGTT TCGTTCTTGC GCTCTCCGAG GGCCATTGCA TGGAGCCG

48

【0042】

配列番号2

配列の長さ：48

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CGGCTCCATG CAATGGCCCT CGGAGAGCGC AAGAACGAAA CAAGGCGC

48

【図面の簡単な説明】

【図1】

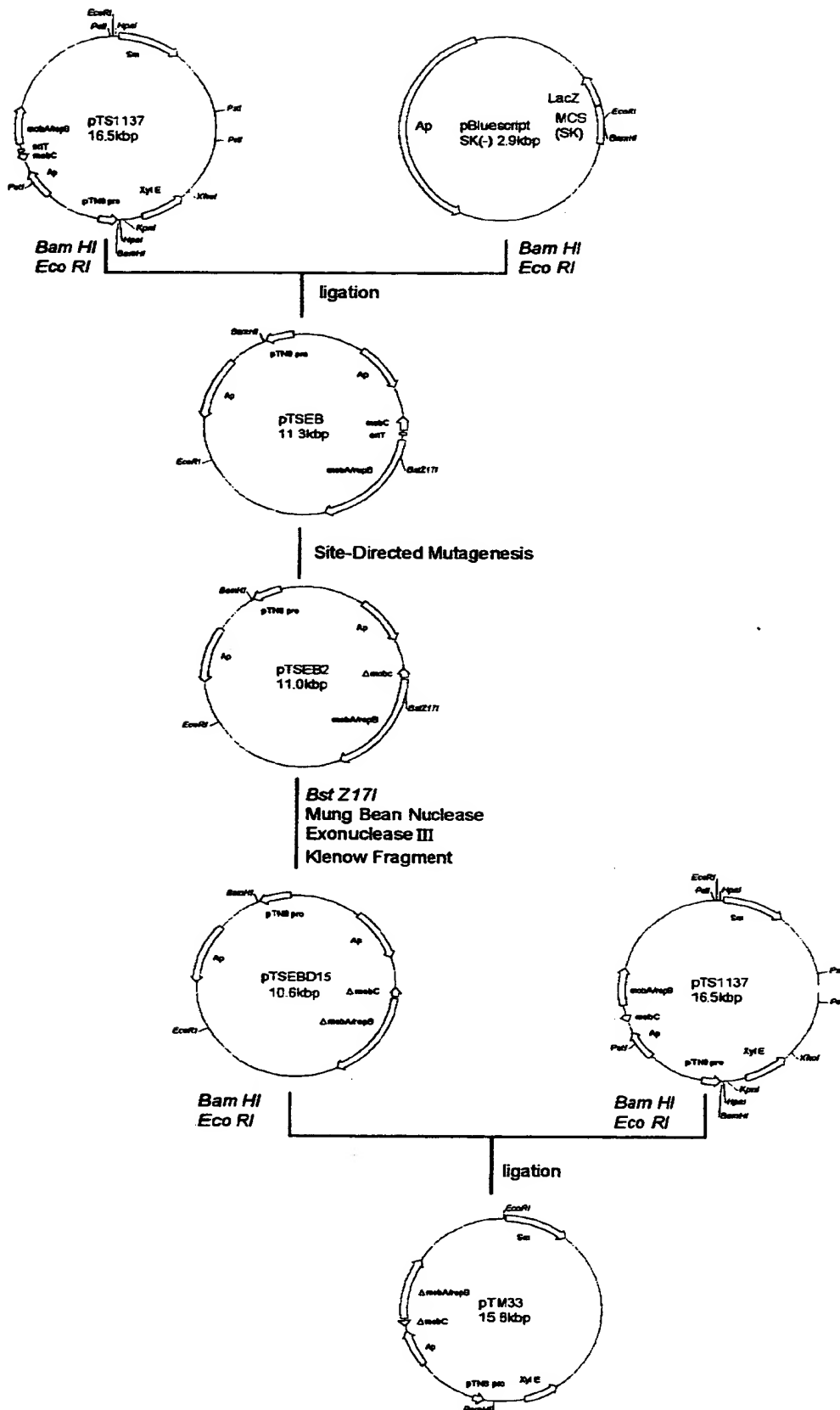
pTS1137よりpTM33の構築スキームを示す図である。

特 2 0 0 0 - 0 1 3 2 6 4

【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】安全に、かつ安価で効率よく、PQQを補欠分子族とする酵素を遺伝子組換え技術により生産するための方法を提供する。

【解決手段】PQQを補欠分子族とする酵素の遺伝子を含有するDNA断片が接合伝達能を予め除去された広域宿主ベクター、特に不和合性P-4群に属するプラスミドに組み込まれてなり、シュードモナス属細菌内で発現可能であることを特徴とするプラスミド、該プラスミドがPQQを補欠分子族とする酵素の生産能を有する細菌に導入された形質転換体、および該形質転換体を培養することによるPQQを補欠分子族とする酵素の製造法。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 〔000003160〕

1. 変更年月日 1990年 8月10日
[変更理由] 新規登録
住 所 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
氏 名 東洋紡績株式会社

BEST AVAILABLE COPY